

REPUBLIQUE DU SENEGAL

-----  
MINISTERE DE LA RECHFRCHE  
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

-----  
INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES  
AGRICOLES (I.S.R.A.)

-----  
LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE  
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

2V0000636

PREPARATION DU VACCIN ANTIPERIPNEUMONIQUE  
LYOPHILISE T1 / 44

-----  
Par M.P. DOUTRE  
Chef du Service de Bactériologie  
LNERV / ISRA

REF. N° 32/MICROBIO.

MAI 1983

Le vaccin antipéripleurmonique préparé au Laboratoire national de l'Élevage et de Recherches vétérinaires (Dakar) résulte de la lyophilisation d'une culture dense en bouillon de la souche vaccinale T1/44 de Mycoplasma mycoides.

## I - COMPOSITION ET PREPARATION DU MILIEU

La composition du milieu de culture est due aux travaux effectués au Laboratoire de Ndjaména (milieu F 66, rapport présenté par A. PROVOST à la 3<sup>ème</sup> Réunion des Experts sur la Péripleurmonie bovine FAO/OIE/OAU, tenue à Khartoum en février 1967) et de ceux des chercheurs australiens du CSIRO.

Quelques modifications ont été apportées : elles portent sur la suppression de l'acide palmitique, pratiquement insoluble même dans une solution de soude 0,1 M et sur la préparation et la quantité d'extrait frais de levure ajouté.

Un lot de vaccin est préparé à partir de 12 litres de milieu liquide contenu dans un ballon unique pourvu d'un barreau aimanté (vortex en fin de culture).

### - Macération du coeur

On provoque la macération pendant une heure dans 10 litres d'eau distillée à 50°C de 5 kg de hachis de coeur de boeuf dégraissé (achat des coeurs à l'abattoir), puis on porte à ébullition. Filtration à chaud sur papier.

On ajoute pour 10 litres de macération :

. Bacto tryptose .....	100 g
. Glucose .....	20 g
. Phosphate disodique .....	25 g

On chauffe à 80°C ; filtration à chaud.

Addition de :

. Glycérol .....	3 g
. Acide oléique .....	150 mg
. Extrait de levure .....	1 l
. Sérum de cheval décomplémenté .....	1 l
. Pénicilline .....	8.000.000 UI

Le pH est amené à 8,1 avec une solution de soude 10 M. L'acide oléique est mélangé à 50 ml de soude 0,1 M. Le gel formé est dissout par agitation magnétique.

- Préparation de l'extrait de levure utilisé.

L'extrait de levure préparé extemporanément présente des qualités supérieures aux produits correspondants que l'on trouve dans le commerce. La technique de préparation retenue est la suivante (TEMVT, Service de Microbiologie) :

- . Mettre en suspension homogène 1 kg de levure fraîche de boulangerie dans un litre d'eau distillée en présence de 8 ml de chloroforme ;
- . laisser au bain-marie 24 heures à 50°C en agitant de temps en temps ; centrifuger et recueillir un premier surnageant que l'on conserve au froid ;
- . reprendre les culots dans un litre d'eau distillée et les soumettre à quatre cycles gel-dégel :
- . centrifugez-de nouveau et recueillir le deuxième surnageant ;
- . mélanger les deux surnageants ;
- . filtrer sur filtre Seitz EKS 1 (une clarification préalable sur membrane AS peut faciliter la filtration finale) ;
- . conserver à -20°C.

II - STERILISATION DU MILIEU

La stérilisation de 10 litres de milieu est pratiquée par filtration sur filtre Seitz EKS I de 10 litres, après une clarification préalable sur membrane AS.

Le branchement filtre-ballon est effectué grâce à l'emploi, sous la flamme, des tubes de jonction normalisés mâle-femelle SOVIREL (14/23) (voir utilisation de l'appareil de Sterne dans la préparation des vaccins contre les pasteurelloses).

III - INOCULUM

a) Réceptient :

Un Erlen-Meyer de 2 litres à la base duquel a été soudée une tubulure de 6 cm (travail du verre dans un atelier spécialisé).

Sur la tubulure est emboîté un tube souple en rhodorsil ( $\emptyset$  8 mm, résistance à la température d'autoclavage) terminé par un tube en verre obturé par une effilure. Une pince clamp à lames parallèles de 6 cm est placée au niveau du tube souple.

.../...

b) Milieu :

C'est le milieu décrit ci-dessus, sous un volume de 1 litre.

c) Stérilisation :

Filtration dans les mêmes conditions que celles, décrites ci-dessus.

d) Inoculation

La souche vaccinale T1/44 de Mycoplasma mycoides est conservée sous forme de banque lyophilisée (1/3 de culture en bouillon, 2/3 de sérum de cheval décomplémenté ou tout autre milieu de lyophilisation : lait écrémé, mist-dessicans, etc.,,)

A partir d'une ampoule de la banque, une série de 5 tubes sont ensemencés et mis à incuber à 37°C. Après 4 jours de culture, les cultures en tubes servent à ense-  
mencer l'Erlen-Meyer contenant le milieu de l'inoculum. Ce dernier est mis à in-  
cuber 3 jours à 37°C avant d'être utilisé pour ensemencer le ballon de 12 litres  
de milieu.

1 - DEROULEMENT DE LA CULTURE

Pour la préparation du vaccin, on utilise une culture de 72 heures à 37°C. Au cours des dernières 24 heures, les ballons sont portés sur agitateur magnétique (aération par vortex).

2 - LYOPHILISATION ET EMPLOI

- 520 g de lait écrémé sec sont ajoutés stérilement à la culture (environ 13 litres :  
1'2 litres de milieu + 1 litre d'inoculum) :

- la répartition se fait sous un volume de 5 ml par flacon type pénicilline de 20 ml  
à l'aide d'une seringue automatique Cornwall ;

- lyophilisateur : USIFROID SMER (Procédé RIEUTORD) ; temps de lyophilisation 26 heu-  
res.

• Cassage du vide sous azote,

Bouchage,

Capsulage,

Impression des flacons.

Au moment de l'emploi, le contenu de chaque flacon est reconstitué avec 40 ml d'eau  
distillée froide (40 doses vaccinales).

## VI - CONTROLES

### a) Immunité

La valeur de l'immunité conférée par le vaccin antipéripneumonique lyophilisé préparé à l'aide de la souche T1 a été démontrée dans différents laboratoires, A Dakar, au cours des années 1968 et 1969, la méthode dite de contact? mise au point par les chercheurs australiens, a permis d'établir que 3 mis et 7 mis et demi après la vaccination, l'immunité est totale : 14 mois après l'immunisation, elle est encore de 90 p.100. Dans ces conditions, une période de protection minimale de 1 an peut être garantie (DOUTRE, M.P.; CHAMBRON J. : Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1970, 23 (2) : 163 - 179).

Il est évident qu'il est absolument impossible d'effectuer une expérience contact pour chaque lot de vaccin produit. La valeur de l'immunité de la souche T1/44 ayant été prouvée une fois pour toutes pour un vaccin titrant au minimum  $10^7$  microorganismes viables par dose vaccinale (1 ml), pour chaque lot, le contrôle se ramène donc à un titrage du nombre de microorganismes viables par ml. Ce nombre doit être égal (au minimum) ou supérieur à  $10^7$  (valeur retenue par les Experts Péripneumonie bovine FAO/OIE/OAU).

#### Titrage

Au laboratoire de Dakar, on utilise la méthode de McCRADY (CALMETTE, POCQUET & NEGRE : 1948) .

- 1 dose vaccinale est mise en culture dans un tube à essais contenant 9 ml de milieu liquide (dilution  $10^{-1}$ ), par la méthode des dilutions successives, on prépare ces dernières de  $10^{-2}$  à  $10^{-10}$  (1er portoir).
- Avec chacune des dilutions  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ , on ensemence 5 tubes de bouillon de 9 ml avec 1 ml de dilution (2ème portoir). Il reste donc dans chacun des tubes originaux  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ , 4 ml de milieu (1er portoir).

L'ensemble des tubes est porté à l'étuve à 37°C et le développement des cultures observé et noté tous les jours jusqu'au 10ème jour, alors s'effectue la lecture finale,

Du développement des cultures sur le second portoir on déduit le nombre caractéristique (utilisation de la table), lequel permet de déterminer la quantité de microorganismes viables contenus dans une dose vaccinale.

b) Innocuité

C'est celle de la souche T1/44.

On sait que des réactions post-vaccinales sont toujours à craindre sur des animaux (taurins surtout) vivant dans des zones où la vaccination n'a pas été pratiquée récemment. Dans ce cas, il est bien sûr conseillé de vacciner expérimentalement un petit nombre d'animaux et d'observer (10 jours à 3 semaines) l'apparition possible d'un oedème à tendance envahissante de type Willemsien, toute extension jugée dangereuse pouvant être jugulée par le recours à un antibiotique antimycoplasmique (Tylosine, Spiramycine, Terramycine, etc. ..). La mauvaise observation du lieu d'inoculation (1/3 supérieur de la côte) est bien souvent une cause favorisant l'apparition d'une réaction post-vaccinale étendue.

Si sur certains troupeaux, la souche T1/44 s'avère par trop dangereuse, alors s'impose la vaccination à l'aide de la souche KH 3J beaucoup moins virulente, mais dont la qualité de l'immunité conférée est nettement inférieure à celle de T1/44.

c) Stérilité

Le contrôle de stérilité est classique, il s'effectue sur milieu liquide aérobie et anaérobie,